

平成23年度福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究」 腎臓領域におけるレドックス制御機構の解明と臨床展開

研究代表者： 糟野 健司（医学部・助教）

共同研究者： 木村 秀樹（医学部・准教授）、高橋 直生（医学部・助教）

概 要	急性腎障害（AKI）の死亡率は50年前と同様に50%を上回り、生命予後不良である。予後不良の一原因として早期診断法の欠落により治療開始時期の遅れが指摘されている。AKIの発症には酸化ストレスが重要な基盤病態と考えられているが、現時点で酸化ストレスに特異的な診断法は確立されていない。そこで本研究では平成22年度挑戦的萌芽研究採択課題で発見した急性腎障害での超早期の尿中TRXの特異的上昇という生体レドックス反応を応用発展させ、酸化ストレスに特異的でリアルタイムに動き、簡便でベッドサイドで利用可能な新規の迅速レドックス診断法を開発し、AKIの早期診断のためのツール開発を目的とし研究を行った。
関連キーワード	急性腎障害、酸化ストレス、迅速診断法、レドックス、チオレドキシン、尿検体

研究の背景および目的

急性腎障害（AKI）の診断法・病態解明・治療の研究はまだ緒についたばかりである。予後改善のためには早期診断が不可欠とされており、古典的なクレアチニンに代わる早期マーカーとして尿中NGALなどが提唱されている。AKIは酸化ストレス、虚血、感染症、薬剤性など様々な病態により引き起こされるが、中でも酸化ストレスは重要な基盤病態の一つと考えられている。しかし、現時点で病因特異的なAKI診断法は確立されていない。

本研究は、平成22年度に挑戦的萌芽研究で採択された「新規尿検査としての尿中エキソゾーム分画中腎症マーカー蛋白の検出」の研究過程で発見した「AKIにおける酸化ストレス制御因子チオレドキシン（TRX）の尿中増加」という現象を発展させる

ものである。チオレドキシン（TRX）は酸化ストレスによって誘導され、細胞外に分泌されるレドックス制御タンパクで、血中TRXは虚血性心疾患などで高値を示すことが知られているが、尿中TRXについては報告がない。

今回の研究では、①尿中TRXの上昇が酸化ストレスに特異的に反応したものであるかを再確認し、②臨床現場で早期治療開始を可能にするための迅速診断法開発に必要な基礎技術の確立を目標とした。これらの研究により、AKIの詳細な病因診断が可能となり、病態に即した病因別AKI治療が早期に開始出来るようになり、AKIの予後改善に寄与することが期待される。

研究の内容および成果

① 尿中TRXの酸化ストレス特異性の検証

尿中TRXに関する報告がほとんど無いため、尿中TRXを様々な8腎疾患で測定した。尿中TRXはAKIで特異的に上昇しており、カットオフ値を35.2 ng/mgCrとした場合、感度0.9、特異度0.82、AUC0.9の高精度でAKIの診断に有用であることが判明した。尿中TRXが早期AKIマーカーとして利用可能かどうかを調べるために、人工心肺開始後、1時間毎に採尿をして尿中TRXの推移を調べた。尿中TRXは早期AKIマーカーの代表である尿中NGALとほぼ同時に2時間で上昇した（図1）。これに対し、現在、診断基準に用いられている血清クレアチニン（Cr）は手術後36-48時間後に遅れて上昇した（図2）。尿中TRXは尿細管障害の指標である尿中NAGや萎縮尿

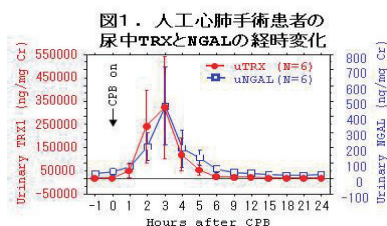


図1. 人工心肺手術患者の尿中TRXとNGALの経時変化

細管の程度と有意な相関を認めた。さらにマウスの腎でのInSitu hybridizationやリコンビナントヒトTRXを静注したマウス腎をヒトTRX特異的モノクローナル抗体で免疫染色することにより尿中TRXの由来を調べた。定常時には腎尿細管局所でTRXが産生され、さらに血中からもTRXが糸球体でろ過され、尿細管で再吸収され、尿細管細胞内に蓄えられることを確認した。AKIでの尿中TRX増加機序を調べるため虚血再還流後のマウス腎を継続的に免疫染色で観察した。染色結果から定常時に蓄えられたTRXがAKIの酸化ストレスにより尿細管細胞から尿中に逸脱し、さらに尿細管障害で再吸収出来ないため尿中に検出されることが示唆された。さらに酸化ストレス特異性を観察するために培養ヒト尿細管細胞に過酸化水素水やリポポリサッカライド（LPS）を

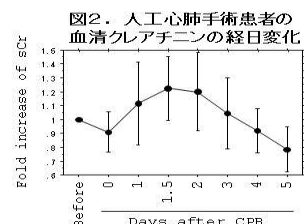
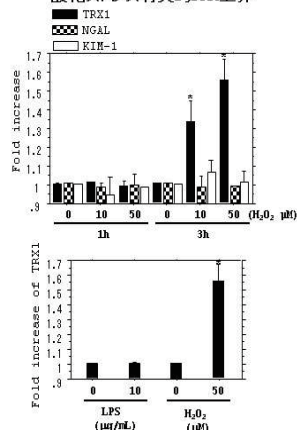


図2. 人工心肺手術患者の血清クレアチニンの経日変化

添加し、培養上清中の TRX や既存の AKI マーカー、NGAL、KIM-1 を調べた。TRX のみが過酸化水素水の濃度依存性に特異的に上昇を示した。

図3.尿管培養細胞の培養液上清における酸化ストレス特異的TRX上昇



TRX の上昇は過酸化水素水のみで認められ LPS では認めなかった (図 3)。

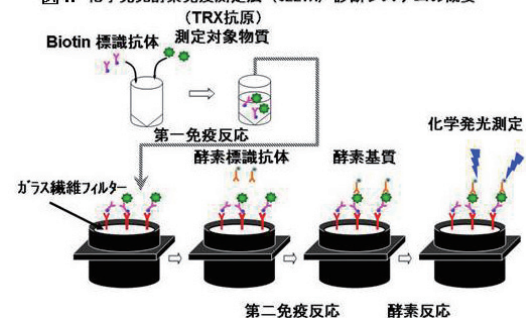
(Am J Physiol 投稿中)

② 尿中 TRX の迅速測定法 (化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA)) の開発

①の結果から尿中 TRX は他の AKI マーカーに比べ超早期に酸化ストレス特異的に上昇することが示

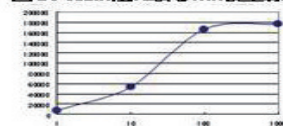
唆された。これら尿中 TRX の特徴を生かすため、迅速診断法の開発に取り組んだ。アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗 TRX 抗体とビオチン標識抗 TRX 抗体を用いたサンドイッチアッセイによって固相フィルター上に TRX 抗原をトラップし、そ

図4. 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) 診断システムの概要



の後 ALP の基質である発光基質を固相フィルターに添加することによって得られる発光シグナルを光電子増倍管 (PMT) を用いて検出を試みた (図 4)。従来の ELISA 法では 8 時間程度であったアッセイ時間が本測定法では 10 分程度で測定が完了した。リコンビナント TRX 段階希釈液をサンプルとして良好な検量線を得ることが出来た (図 5)。

図5. CLEIA法によるTRX検量線



本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

<論文発表>

Kasuno et al. Urinary thioredoxin 1 is an oxidative stress-specific biomarker of acute kidney injury. Am J Physiol in submission.

<学会発表>

Kasuno et al. Urinary thioredoxin is a predictive biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of International Society of Nephrology 2011.

Kasuno et al. Urinary thioredoxin 1 is an oxidative stress-specific biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of American Society of Nephrology 2011.

Kasuno et al. Urinary thioredoxin is an oxidative stress associated biomarker of acute kidney injury. Poster presentation in Annual Meeting of International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011.

糟野健司ら 「レドックス制御蛋白「尿中チオレドキシ」の酸化ストレス特異的急性腎障害 (AKI) マーカーとしての有用性」平成 23 年度日本腎臓学会学術総会 口頭発表

糟野健司ら

「急性腎障害 (AKI) の病因別診断に尿中チオレドキシが有用である」平成 23 年度日本臨床検査医学会学術集会 口頭発表

「特記事項」

平成 23 年度日本腎臓学会学術総会優秀演題賞受賞
国内特許、国際特許出願準備中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

科学研究費補助金 基盤研究 (C) (H24~H26)

レドックス生体応答反応を利用した新規のベッドサイド迅速酸化ストレス診断法の開発 研究代表者 申請中

平成 24 年度 福井大学研究育成経費 東日本大震災からの復興に関連する調査・研究の支援

研究代表者 申請予定

科学研究費補助金 基盤研究 (B) (H23~H25) 酸化ストレスに対する新規のレドックス診断法の開発 (代表 中村肇) 分担 H23 年度 960 万円

平成 23 年度 福井大学トランスレーショナルリサーチ推進センターTR センター公募採択型研究助成 急性腎障害に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究 研究代表者 15 万円

平成 23 年度 福井大学 FS 可能性試験助成経費急性腎障害に対する酸化ストレス特異的迅速レドックス診断法の開発についての研究

研究代表者 50 万円

平成 23 年度 福井大学研究育成経費「若手研究者による今後の進展が期待できる研究の支援」腎臓領域におけるレドックス制御機構の解明と臨床展開 研究代表者 90 万円